

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Kateřina Habalová

**Využití genomiky při studiu speciace**  
**Genomic approach in speciation studies**

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Pavel Hulva, Ph. D.

Praha 2016

## **Poděkování**

Velice ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Pavlu Hulvovi, Ph.D. za ochotu, množství cenných rad, připomínek a času, jež při pročítání práci věnoval. Také bych ráda poděkovala své rodině a přátelům, kteří mi při psaní byli velkou oporou.

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 17. 8. 2016

Kateřina Habalová

## Abstrakt

Speciace, adaptace a hybridizace jsou tři pojmy, každý označující jiný proces, přesto ale mají velmi mnoho evolučních souvislostí. Při speciaci dochází k rozštěpení původní mateřské linie na dvě sesterské nebo pouze k odštěpení dceřinné linie od mateřské, nicméně se jedná o proces vedoucí ke vzniku nového druhu. Stejně tak adaptace i hybridizace mohou vést ke vzniku nového druhu, kdy při adaptaci tento druh vzniká přizpůsobením se novým podmínkám, zatímco při hybridizaci je potomkem dvou různých linií, křížících se mezi sebou. Této problematice se věnuje většina práce, menší část je věnována i konkrétním příkladům. Zahrnuta je i kapitola o metodách sekvenování nové generace, které jsou v poslední době stále více využívány v evolučních studiích.

**Klíčová slova:** speciace, adaptace, hybridizace, genomika, sekvenování nové generace

## Abstract

Speciation, adaptation and hybridization are three concepts, each one referring to different process but having a common evolutionary context. Maternal line splits into two sister lines or only one line cleaves from maternal one during speciation. However it leads to formation of new species. Adaptation and hybridization can lead to formation of new species as well. New species arise by adapting to new conditions during adaptation. Within hybridization it is a descendant of two different lines mating amongst themselves. Most of this thesis is being addressed to these issues, the lesser part is addressed to specific examples. The chapter about next-generation sequencing methods is also included, as these methods have been used more frequently recently.

**Key words:** speciation, adaptation, hybridization, genomics, next-generation sequencing

## Seznam použitých zkratk

ASGE	alela-specifická genová exprese
DMIs	Dobzhansky – Muller nekompatibility
DNA	deoxyribonukleová kyselina
F1	první filiální generace
mtDNA	mitochondriální DNA, chondriom
NGS	sekvenování nové generace
PacBio	Pacific Biosciences
QTL	kvantitativní znak loci
RAD	restrikční místa DNA
SMRT	sekvenování jedné molekuly v reálném čase
SNP	jednonukleotidový polymorfismus

# Obsah

1.	Úvod .....	1
2.	Jednotlivé NGS metody .....	2
2.1	Klasické metody.....	2
2.1.1	454.....	2
2.1.2	SOLiD .....	2
2.1.3	Illumina.....	2
2.1.4	PacBio .....	3
2.2	Polovodičové metody .....	3
2.2.1	Ion Torrent.....	3
2.3	Nanopóry.....	3
2.3.1	Nanopore.....	3
3.	Další důležité metody .....	5
3.1	Sekvenování pomocí RAD tagů .....	5
3.2	DNA metabarcoding .....	5
3.3	Jednonukleotidové polymorfismy (SNPs) .....	5
4.	Speciace.....	6
4.1	Co je speciace .....	6
4.2	Typy speciace .....	6
4.2.1	Alopatrická speciace .....	6
4.2.2	Sympatrická speciace.....	6
4.2.3	Parapatrická speciace .....	7
4.2.4	Peripatrická speciace .....	7
5.	Speciační genomika .....	8
5.1	Reprodukční bariéry a izolace.....	8
5.2	Speciace genovým konfliktem .....	9
5.3	Speciace řízená Dobzhansky-Muller nekompatibilitami (DMIs).....	9
5.4	Ekologická speciace .....	10
5.5	Speciační kontinuum a genomové skeny .....	11
5.5.1	Speciační kontinuum .....	11
5.5.2	Genomové skeny .....	12
6.	Adaptace .....	14
6.1	Co je adaptace .....	14
6.2	Lokální adaptace v populacích s genovým tokem.....	14
6.3	Adaptace v izolovaných populacích .....	15

6.4	Mapování adaptací .....	16
6.5	NGS studie adaptací .....	16
7.	Hybridizace.....	18
7.1	Co je hybridizace.....	18
7.2	Faktory ovlivňující frekvenci hybridizace .....	19
7.2.1	Izolační mechanismy.....	19
7.2.2	Stáří divergence .....	19
7.2.3	Rozdílnosti specifické pro taxony.....	19
7.3	Identifikace hybridů.....	20
8.	Závěr.....	22
9.	Seznam použité literatury .....	23

# 1. Úvod

Vznik nových druhů, jejich adaptace nebo hybridizace je nikdy nekončícím koloběhem. Díky vývoji v technologiích se mnoho z těchto procesů stává přístupných vědeckému zkoumání. Jedním z přístupů, jak tyto rozdíly studovat, je analýza DNA. Zásadní inovací, která umožnila přechod od studia jednotlivých genů ke studiu celých genomů, jsou metody sekvenování nové generace neboli next-generation sequencing (dále jen NGS). V evoluční biologii se jedná o zásadní technologickou inovaci, neboť mnoho ze základních evolučních procesů probíhá na úrovni celého genomu.

Tyto metody byly vyvinuty v devadesátých letech minulého století v souvislosti s vývojem nanotechnologií a od té doby prošly značným vývojem. Od roku 2005 jsou komerčně dostupné. Cílem této práce ovšem není se dopodrobna zabývat jednotlivými metodami, ale jejich praktickým využitím na poli mikroevolučních disciplín.

Obecně je NGS označováno jako masivní paralelní sekvenování právě kvůli tomu, že sekvenujeme paralelně v oddělených mikrokompartmentech velké množství krátkých řetězců, což ve výsledku dává o několik řádů vyšší objem dat než sekvenování založené na Sangerově metodě. Vzhledem k velkému objemu dat jsou nedílnou součástí těchto metod náročné bioinformatické postupy. Vývoj NGS technologií probíhal nezávisle ve formě několika platforem vyvíjených různými firmami. Každá metoda je založena na poněkud odlišném přístupu a má své výhody i nevýhody.



## 2. Jednotlivé NGS metody

### 2.1 Klasické metody

#### 2.1.1 454

Tato metoda má několik kroků. Nejprve se „rozstříhá“ celý genom a z jeho částí se pak vytvoří náhodná knihovna fragmentů DNA. K nim se přidají adaptéry a celé fragmenty se přichytí na svou kuličku uvnitř kapiček emulze. Poté probíhá emulzní PCR. Posledním krokem tohoto procesu je enzymatická reakce při začlenění nukleotidu, která je pozorována díky světelnému signálu. (Margulies *et al.*, 2005)

#### 2.1.2 SOLiD

Při užití této metody je sekvenační primer připojen ke každé jednovláknové kopii z knihovny. Rozdíl je v tom, že při sekvenaci není využívána polymeráza ale ligáza, která k primeru naváže fluorescenčně značenou sondu. Primer se sondou je navázán ke komplementárnímu řetězci a je odštipnuta část s barvou z 5' konce, čímž je koncový fosfát připraven na další ligaci. Toto se opakuje, dokud není celý řetězec pokryt sondami. Poté je primer odmyt a celý proces se opakuje s tím rozdílem, že je primer o jeden nukleotid kratší. Celý proces je opakován ještě třikrát. Následně je možné odvodit původní pozici jednotlivých nukleotidů. Pro paralelizaci tohoto procesu se využívá stejných kuliček, jako u metody 454. (Kircher & Kelso, 2010)

#### 2.1.3 Illumina

Výhoda této metody spočívá v tom, že vytváří až padesátkrát více čtení než pyrosekvenování, ale při prvních užitích této metody byly pouze 35 bp dlouhé. Po několika vylepšeních se toto číslo zvedlo na 100 bp (HiSeq 2000). Illumina využívá strategie, že molekula DNA může být sekvenována z obou konců (Zhou *et al.*, 2010). Knihovny DNA hybridizují a tvoří oligostruktury, které ve velmi malých koncentracích procházejí průtokovou komoru, váží se na oligonukleotidy k nim komplementárním na stěnách komory a probíhá můstková amplifikace (PCR zde probíhá na pevném povrchu na rozdíl od 454). Ta vytvoří

shluky, z nichž každý obsahuje více než 1000 kopií počáteční molekuly. Poté probíhá sekvenace syntézou a při začlenění nukleotidu se objeví světelný signál. (Kircher *et al.*, 2009)

#### 2.1.4 PacBio

Tato metoda byla vynalezena firmou Pacific Biosciences, proto zkratka PacBio. Od předchozích metod se v několika věcech liší. Poskytuje mnohem delší čtení, v průměru je to více než 1 kb. Navíc zde při vytváření knihovny neprobíhá žádné pomnožení templátu a tím se dá vyhnout obvyklým nepřesnostem (Carneiro *et al.*, 2012). Jde o technologii SMRT (single molecule real time sequencing). Jako templát zde slouží pouze jediná molekula DNA. Při čtení templátu polymeráza začleňuje fluorescenčně označené báze. Každá báze má odlišnou fluorescenční barvu, která se při začlenění odštěpí a emituje signál. (McCarthy, 2010)

### 2.2 Polovodičové metody

#### 2.2.1 Ion Torrent

U této metody probíhá ze začátku příprava DNA pro sekvenaci obdobně jako u 454. Nejprve se DNA rozdělí na části, ty se připojí k adaptérům a tyto knihovny jsou pomocí emulzní PCR připojeny na kuličky (Ion Sphere Particles). V dalším kroku jsou na templáty navázány primery a DNA polymeráza a poté jsou napipetovány na polovodičový čip. Pokud je při průběhu sekvenace zařazen komplementární nukleotid, dojde k hydrolýze a uvolnění vodíku, což má za následek změnu pH. Tu lze detekovat senzorem. (Rothberg *et al.*, 2011)

### 2.3 Nanopóry

#### 2.3.1 Nanopore

Poslední popisovaná metoda je diametrálně odlišná od ostatních. Nabitá nukleová kyselina je napětím poháněna skrz 1,5 – 2,0 nm velký pór v proteinovém kanálu, který je součástí fosfolipidické membrány. Membrána je utvářena skrz mikrometrové štěrby a odděluje dva roztoky obsahující ionty. Translokace každé části nukleové kyseliny je zaznamenávána buď jako modulace nebo blokáda nanopóru. Blokáda se objeví vždy, když se na něm translokovaná

část zachytí. I přesto že nanopór detekuje v danou chvíli pouze jedinou molekulu, projde jím během několika sekund molekul mnoho. (Meller & Branton, 2002)

### 3. Další důležité metody

#### 3.1 Sekvenování pomocí RAD tagů

Restrikční místa na DNA (RAD) jsou markery, představující krátké úseky DNA, patřící každý k určitému restrikčnímu enzymu (Baird *et al.*, 2008). Hybridizací těchto RAD tagů získáme mikročipy DNA, které nám umožní screening tisíce polymorfních markerů (Miller *et al.*, 2007).

Využití RAD tagů má několik výhod. Za prvé vytvářejí redukované zobrazení genomu, což umožňuje například detekování SNPs (jednonukleotidových polymorfismů). Dále může být vybrán určitý počet markerů pomocí restrikčního enzymu a ten může být pomocí dalšího enzymu zvýšen. Také se tento přístup dá využít při genotypování smíšených populací. (Baird *et al.*, 2008)

#### 3.2 DNA metabarcoding

Další široce využívanou metodou k identifikování DNA je DNA metabarcoding. Díky rozvoji NGS technologií byly limitace spočívající v počtu vzorků, které mohou být identifikovány, odstraněny a tato metoda se může rozvíjet. Její unikátnost spočívá v tom, že jsme schopni DNA identifikovat, přestože ji máme degradovanou (takové vzorky se získávají nejčastěji z hlíny, vody nebo výkalů). Tato metoda může být využita i na velice staré vzorky. (Taberlet *et al.*, 2012)

#### 3.3 Jednonukleotidové polymorfismy (SNPs)

Pro výzkum je velice důležité detekovat polymorfismy (odlišnosti) v DNA. K tomu právě slouží SNPs, které představují odlišnosti jednotlivých nukleotidů v sekvenci DNA. Pokud se nacházejí v kódujících nebo regulačních oblastech, tak se pravděpodobnost, že způsobí funkční rozdílnost daného místa, mnohonásobně zvyšuje (Collins *et al.*, 1998). Jsou využívány pro různé genetické analýzy od mapování genomu k dohledávání specifických mutací (Neff *et al.*, 2002).

## 4. Speciace

### 4.1 Co je speciace

Speciace je evoluční proces, při němž vznikají nové druhy. Ty mohou vznikat několika způsoby. Původní mateřský druh může být rozštěpen na dva sesterské, kdy se každý od původního liší. Druhou možností je, že se odštěpí a změní jen jeden druh a druhý zůstane stejný. Příčiny toho, proč druhy speciují, jsou buď vnější, vnitřní nebo kombinací obojího a budeme se jimi zabývat v dalších kapitolách. Vždy je ale výsledkem speciace mutace v genetickém kódu a tím zapříčiněná změna.

Evoluce je zejména procesem vytváření a změn diverzity a vzniku adaptací. Pro nás je důležitá evoluční radiace, která zvyšuje diverzitu taxonů. Typickým příkladem evoluční radiace je Kambrická exploze. Během krátké doby díky ní fylogenetický strom neuvěřitelně zhoustl. Každé větvení tak odpovídá určité speciační události. (Hamann, 2013)

Základním znakem přírodního světa je rozdílnost v bohatosti druhů. Tato bohatost se liší jak mezi jednotlivými skupinami organismů, tak i mezi jednotlivými geografickými oblastmi (Rabosky, 2009).

### 4.2 Typy speciace

#### 4.2.1 Alopatriká speciace

Podstatou alopatriké speciace je geografická bariéra (může být například řeka nebo pohoří) mezi populacemi. Při alopatriké speciaci není přítomen genový tok, takže reprodukční izolace vyvstává postupně a náhodně jako výsledek mutací, genetického driftu a nepřímých efektů přirozené selekce, která pohání lokální adaptace. Může proběhnout i takzvané „zesílení“ přirozené selekce, které řídí speciaci ještě rychleji. (Hoskin *et al.*, 2005)

#### 4.2.2 Sympatriká speciace

Tento typ speciace je v podstatě opakem alopatriké speciace. Nové druhy totiž nevznikají kvůli geografické bariéře. Tento typ speciace by se dal spíše vysvětlit jako kompetice o potravní zdroje. Také je zde uvažováno preferenční párování. To často vede k reprodukční izolaci mezi ekologicky se rozbíhajícími populacemi. (Dieckmann & Doebeli, 1999)

#### 4.2.3 Parapatrická speciace

Je to speciace probíhající díky genovému toku mezi sousedícími subpopulacemi. Není nutná ani úplná geografická izolace. Tento typ speciace nevyužívá odlišnou selekci pro lokální adaptaci. Tyto speciační události mají například vyšší míru mutací nebo vyšší lokální hustotu. Probíhají v okrajových částech populací. (Gavrilets *et al.*, 2000)

#### 4.2.4 Peripatrická speciace

Při peripatrické speciaci opět dochází ke speciačním procesům pouze u okrajových populací. Druhy v okrajových populacích musí nejprve dokončit jednu speciační událost, než mohou speciovat znovu. Druhy v populacích hlavních mohou speciovat kdykoliv. Areály jednotlivých druhů jsou různě velké, protože vznikají rozštěpením jednoho původního druhu. (Losos & Glor, 2003)

## 5. Speciační genomika

Speciační genomika může pomoci osvětlit vztahy mezi evolučními procesy a odlišností genomických vzorů a mezi genomickými vlastnostmi a speciačními procesy. Řeší vliv genomických vlastností na evoluci reprodukčních bariér (Seehausen *et al.*, 2014), které jsou pro speciaci ve většině případů nutné.

### 5.1 Reprodukční bariéry a izolace

Základním cílem speciačního výzkumu je zjistit počet a vlastnosti genů, které se podílejí na vytváření reprodukčních bariér a tím pádem na tvoření reprodukční izolace mezi blízce příbuznými druhy. Příkladem reprodukčních bariér může být samčí hybridní sterilita a samičí druhová preference. (Noor *et al.*, 2001)

Tyto bariéry se tvoří postzygoticky nebo prezygoticky. Jak už bylo uvedeno, jedna z nich ovlivňuje nekompatibilitu hybridů – tou je postzygotická izolace. Prezygotickou izolací je rozpoznávání druhů (Servedio & Saetre, 2003). Prezygotickou je proto, že pokud samice „nerozpozná“ samce, nezdá se jí vhodný a tedy se s ním nespáří, neproběhne tak tvorba zygoty.

Geny, které kontrolují tyto sexuální a reprodukční znaky jsou nejhojnější na pohlavních chromozomech. Existuje propojení mezi geny, které ovlivňují postzygotické a prezygotické izolace, jež vede ke zpětné vazbě, kterou jsou oba typy izolací zesíleny. Spolu s rozvíjením genů způsobujících nekompatibilitu hybridů se rozvíjí a zdokonaluje i schopnost rozeznávání druhů. To vede k silnější nekompatibilitě, a tedy se zvyšuje tlak pro další upřednostňování odlišnosti. (Servedio & Saetre, 2003)

Samčí hybridní sterilita často bývá prvním znakem speciace. Tento sterilní fenotyp ale představuje spíš nový projev funkce genu než jeho redukci či ztrátu. Sterilitu způsobuje například gen *Odysseus* (*OdsH*), který byl studován na octomilce (*Drosophilla*). Za možné vysvětlení rychlé evoluce samčí hybridní sterility je považována sexuální selekce, jelikož bylo prokázáno, že geny, které se vztahují k samčí reprodukci, se vyvíjejí velice rychle. (Sun *et al.*, 2004)

## 5.2 Speciace genovým konfliktem

Genový nebo také sexuální konflikt se objevuje, pokud vlastnosti zvyšující fitness jednoho pohlaví snižují fitness toho druhého. Sexuální konflikt tedy vede k věčnému koevolučnímu závodu mezi pohlavími a k rychlému vzniku evoluční odlišnosti mezi znaky zapojenými v reprodukci (Arnqvist *et al.*, 2000; Gavrillets & Waxman, 2002). Sexuální konflikt přímo selektuje geny, které jsou odpovědné za reprodukční izolaci. Je tedy silným motorem speciace (Gavrillets & Waxman, 2002).

U hmyzu byla provedena studie týkající se sexuálního konfliktu. Vybraly se páry příbuzných druhů hmyzu, které se lišily v příležitosti sexuálního konfliktu po páření. Tato analýza ukázala, že skupiny, které měly příležitost sexuálního konfliktu nebo sexuální selekce, projevovaly vysokou úroveň speciace oproti skupinám bez této možnosti. Tento celkový výsledek nebyl ovlivněn taxonomickým postavením porovnávaných druhů ani ekologií nebo rozložením zahrnutých druhů. Studie prokázala velkou důležitost sexuální selekce a konfliktu při speciaci. (Arnqvist *et al.*, 2000)

## 5.3 Speciace řízená Dobzhansky-Muller nekompatibilitami (DMIs)

Často je speciace výsledkem hromadění neškodných genů v jednom druhu, které ale mohou způsobovat neživotaschopnost nebo sterilitu jedince (hybrida), pokud se dostanou do kontaktu s geny druhu jiného (Orr, 1995). Dlouho byl tento princip nejasný, ale podařilo se ho, nezávisle na sobě, rozluštit dvěma vědcům – Theodosiosovi Dobzhanskému (\*24. 1. 1900, †18. 12. 1975) a Hermannu Josephu Mullerovi (\*21. 12. 1890, †5. 4. 1967).

Dobzhansky tvrdil, že jsou dva odlišné typy hybridní sterility:

1. chromosomální typ – způsobuje jej rozdílnost v hrubé struktuře neboli v seřazení genů,
2. genetický typ – ten je způsoben interakcemi mezi komplementárními genetickými faktory, kterými přispívají oba rodiče.

DMIs způsobuje druhý typ hybridní sterility, kdy například jeden z rodičů má kombinaci alel *SS<sub>tt</sub>* a druhý *ss<sub>TT</sub>*, hybrid je *Ss<sub>Tt</sub>*. Pokud máme populaci, kde je fixovaná alela *S*, jsou genotypy *Ss<sub>tt</sub>* a *SS<sub>tt</sub>* životaschopné a plodné. V druhé populaci, kde je fixována alela *T* platí životaschopnost a plodnost pro kombinace alel *ss<sub>Tt</sub>* a *ss<sub>TT</sub>*. Pokud se ale tyto dvě populace setkají a dojde ke křížení, vznikne hybrid *Ss<sub>Tt</sub>*, který může být neplodný nebo neživotaschopný



(Dobzhansky, 1936). To může být způsobeno například tím, že alela *T* má škodlivý efekt pouze v přítomnosti alely *S* (Orr, 1995).

Tento model speciace je důležitý ze dvou důvodů. Prvním je to, že ukazuje, že k vývoji hybridní sterility nebo neživotoschopnosti není nutný žádný mezikrok. Druhým důvodem je, že ukazuje, že problém původu druhů může být redukován na původ reprodukční izolace a ten zase na výstavbu komplementárních genů (alespoň co se týče postzygotické izolace). (Orr, 1995)

Byla provedena studie týkající se parapatrické speciace pomocí DMIs na pevninsko-ostrovním modelu. Pozornost byla zaměřena na jednosměrný genový tok z kontinentu na ostrov. Model byl upraven tak, aby odpovídal požadavkům pokusu. Při této studii se zjistilo, že existují 2 mechanismy, které řídí evoluci parapatrických DMIs. V různorodém prostředí se můžou DMIs objevit jako vedlejší produkty selekce proti špatně se adaptujícím imigrantům. Navíc selekce nevhodných hybridů může udržovat parapatrické DMIs i ve stejnorodém prostředí. Pro oba tyto mechanismy je důležitá vnější selekce, i přesto že ve výsledku vedou k opačným předpovědím, týkajícím se genetické architektury DMIs a jejich závislosti na evoluční historii. (Bank *et al.*, 2012)

## 5.4 Ekologická speciace

Ekologická speciace je ovlivněna prostředím, ve kterém se daný živočišný druh vyskytuje. Působí na něj vnější podmínky (ať už klimatické nebo potravní) a on se jim buď snaží přizpůsobit → probíhá speciace, nebo se nepřizpůsobí a tím pádem časem vymizí. Proces nahromadění mnoha speciačních událostí v evolučně krátkém čase se nazývá adaptivní radiace. Její jednotlivé trasy probíhají podél speciačního kontinua (viz dále), ve kterém se pomalu kumulují reprodukční izolace působením neekologických procesů, a později následuje ekologická diferenciací (Rundell & Price, 2009). Úspěšná adaptivní radiace má vlastně stěžejní vliv při výskytu biologické diverzity. V souhrnu jsou si všechny organismy na Zemi příbuzné a mají společného předka (Benton, 1995). Divergovat začaly před zhruba třemi až čtyřmi tisíci miliony let (Penny & Poole, 1999).

Mezi místa s druhově nejbohatší faunou vůbec patří korálové útesy. V rámci korálových útesů Atlantského oceánu byla provedena studie 5 druhů ryb z čeledi piskounovitých,

konkrétně šlo o zástupce rodu *Halichoeres*. Jejich jednotlivé genetické linie byly rozděleny podle ekologických odlišností jejich míst výskytu. To znamená, že zde byla zaznamenána fylogenetická přerušení mezi blízkými, ale ekologicky odlišnými habitaty a naopak vysoká genetická propojenost mezi podobnými habitaty, ale oddělenými tisíci kilometry. Toto rozdělení podle ekologické podobnosti míst výskytu, než klasicky podle biogeografických bariér naznačuje, že by se mohlo jednat o parapatrickou ekologickou speciaci, u které je v tomto případě důležitá adaptace k přírodním podmínkám podobných míst. (Rocha *et al.*, 2005)

## 5.5 Speciační kontinuum a genomové skeny

### 5.5.1 Speciační kontinuum

Speciační kontinuum může být definováno jako nepřetržitý sled genetických změn, které se vyskytují ve dvou liniích odlišujících se vzájemně způsobem, jakým dosáhnou reprodukční izolace. Rozdílná evoluce a reprodukční izolace (tedy příčina a její důsledek) jsou hlavními prvky speciačního procesu. (Shaw & Mullen, 2014)

Všechny živočišné druhy procházející speciačním kontinuem prodělávají různé změny a podél speciačního kontinua může situace vypadat různě. V první fázi je ve skupině přítomna pouze kontinuální variace bez reprodukční izolace. V druhé fázi je už částečně nesouvislá variace ve skupině nebo mezi skupinami s částečnými, ale malými reprodukčními izolacemi. Ve třetí fázi je přítomna nesouvislá variace se silnou, ale potenciálně vratnou reprodukční izolací. Čtvrtou fází je kompletní a nevratná reprodukční izolace mezi skupinami. Nicméně hranice mezi těmito fázemi nejsou vždy úplně zřetelné. (Hendry, 2009)

Na toto téma bylo provedeno několik studií. Například v roce 2013 vyšel článek, jenž se zabýval přechodem částečně izolovaného druhu k ještě více odlišitelnému druhu. Byly porovnávány vzory genetické diferenciace mezi nedávno vzniklým druhem dvoukřídlého hmyzu z čeledi Tephritidae, který svá vajíčka klade do jablek a těmi, kteří napadají hloh (*Rhagoletis pomonella*), k jejich sesterskému taxonu, který napadá dřín. (Powell *et al.*, 2013)

Z výsledků vyplývá, že vzor diferenciace mouchy napadající dřín je zhruba stejný, a že mouchy napadající jablka a hloh mají zvýšenou míru ekologické selekce a sníženou efektivitu migrace. Navíc speciace za přítomnosti genového toku v *Rhagoletis pomonella* může zpočátku

způsobovat rychlé dosažení širokogenomového stupně diferenciace a reprodukční izolace, což by bylo následováno změnou hostitelské rostliny. (Powell *et al.*, 2013)

Další zajímavá studie byla provedena na motýlech rodu *Heliconius*. Bylo studováno, jak se mění preference v páření mezi jednotlivými sesterskými taxony, které představují rozdílné úrovně divergence. Výsledky ukázaly odlišné preference v celém areálu tohoto motýla. Pářící preference byly silnější při porovnávání na druhové úrovni. Pod touto úrovní byly pářící preference samců mnohem slabší, se známkami preferování asymetrie. Tato zjištění podporují model ekologické speciace. V tomto případě se izolace před pářením zvyšuje v celém kontinuu a z polymorfních populací se stávají sympatrické, ekologicky odlišné druhy. (Merrill *et al.*, 2011)

### 5.5.2 Genomové skeny

Jednou z hlavních otázek evoluční biologie je, jak může struktura genomu ovlivnit speciaci. Zejména se to týká taxonů vznikajících pod vlivem genového toku. Nedávno se proto pozornost obrátila k takzvaným „ostrovům“ v genomu, ve kterých probíhá speciace pomocí rozdílné selekce. Navíc probíhá pouze u několika málo genů (jen dva až tři), které přebývají v lehce izolovaných oblastech chromozomu. (Michel *et al.*, 2010)

Předpokládá se, že tyto ostrovy podporují speciaci díky snížení účinnosti genového toku v oblastech, které obklopují místa vystavená selekčnímu tlaku. Během ekologické speciace jsou některá místa genomu selekcí ovlivněna a jiná nikoliv. Tento jev je označován jako genetická mozaika speciace. Velmi brzy v této fázi je možné studovat vzorce změn v oblastech genomu, které jsou přímo zapojené v reprodukční izolaci. Toto využívání mozaiky v časně fázi ekologické speciace odhaluje genetické změny, které způsobují ty nejranější reprodukční izolace. Navíc je to bez zbytečných matoucích efektů, které se nakonec mezi druhy naakumulují. (Via & West, 2008)

Díky skenu genomu byla odhalena genová spojitost vzorců společných předků a adaptivní odlišnost mezi 5 sympatrickými druhy vrubozubcovitých ryb (cichlidy) dvou rodů *Pundamilia* a *Mbipia*, které tvoří část velké adaptivní radiace cichlid ve východoafrickém Viktoriině jezeře. U této studie byly markery SNP identifikovány metodou RADseq. Rozdílů mezi páry jednotlivých druhů bylo hned několik, například epigamní zbarvení samců, trofická ekologie,

obsazení odlišných hloubek a také morfologické znaky odlišující oba rody. Vytvořením podmnožin SNPs byla odhalena odlišná historie vývoje pro různé části genomu. (Keller *et al.*, 2013)

## 6. Adaptace

### 6.1 Co je adaptace

Základním úkolem adaptace je přizpůsobit populaci nově vzniklým životním podmínkám. Toto přizpůsobení většinou probíhá tak dobře, že se přitom zvýší i její fitness v porovnání s původní neadaptovanou populací. V tom je rozdíl od speciace, kdy při speciaci jednak vznikají nové druhy (u adaptace vznikají pouze druhy adaptované, ale nelze je ještě považovat za samostatný taxon), ale tyto nové druhy nemusí mít vždy vyšší fitness než původní druh, ze kterého se odštěpily. I přes toto zdánlivě jednoduché rozlišení není ale vždy úplně snadné určit, zda se jedná o speciaci či adaptaci.

Adaptace mohou být jednoduché, podmíněné jedním genem (například změna zbarvení) až klíčové. Ty zahrnují mnoho anatomických změn a přestaveb genomu (například vznik letu u ptáků). Adaptace je tedy jev, kdy selektivní posuny v populaci zvyšují frekvenci výskytu alel s příznivými účinky. Nicméně někteří vědci se domnívají, že by se více pozornosti mělo věnovat takzvané polygenní adaptaci, u které se počítá s důležitostí malých změn ve frekvencích alel, ale na mnoha lokusech. (Pritchard & Di Rienzo, 2010)

### 6.2 Lokální adaptace v populacích s genovým tokem

Jedním z prvních kroků v procesu adaptace a diverzifikace na vyšší taxonomickou úroveň je odlišná adaptace populace stejného druhu. Tato adaptace na úrovni stejné populace vede k lokální adaptaci. Jde o přizpůsobení se populace jejímu prostředí, ve kterém žije (Hereford, 2009). Je dokázáno, že genotypy lokálních populací jsou přirozenému prostředí, ve kterém se vyskytují, lépe adaptovány, než genotypy cizích populací (Zandt & Mopper, 1998).

V populacích mezi kterými dochází k výměně migrantů (tedy ke genovému toku) je lokální adaptace výsledkem rovnováhy mezi selekcí a migrací. Ne vždy ale probíhá bez problémů. Může se vyskytnout mnoho faktorů, které adaptaci buď zpomalí, nebo jí úplně zamezí. Například častá vymírání nebo rekolonizace značně zpomalují vývoj lokálních adaptací (Savolainen *et al.*, 2013). Úplné zastavení vzniku adaptace způsobuje fenotypová plasticita. To je schopnost organismu produkovat několik různých druhů fenotypů v různých prostředích (DeWitt *et al.*, 1998), tím pádem není třeba, aby u organismu adaptace proběhla.

Rozsah lokální adaptace se zvyšuje s vyšší genetickou různorodostí v populaci a s vyšší rozdílností obývaných prostředí mezi populacemi (Gacia-Ramos & Kirkpatrick, 1997). Naopak nízká genetická různorodost způsobená například genetickým driftem může adaptaci omezovat (Hereford, 2009).

Byl proveden průzkum literatury, který ukázal, že lokální adaptace jsou poměrně běžné a že adaptované místní populace mají v daném prostředí v průměru až o 45% vyšší fitness než populace cizí. Dále byla potvrzena teorie ukazující, že adaptivní divergence nezávisí pouze na odlišnosti prostředí a genovém toku, ale že může být ovlivněna také genetickým driftem. (Hereford, 2009)

### 6.3 Adaptace v izolovaných populacích

U populací, které nejsou ovlivněny genovým tokem, může k lokálním adaptacím dojít také. Příkladem je opakovaná kolonizace sladkých vod koljuškou tříostnou (viz dále), která je původně mořským druhem a musela se tedy na život ve sladkých vodách adaptovat. Jedná se o takzvanou paralelní evoluci (Hohenlohe *et al.*, 2010). Paralelní evoluce je děj, kdy nezávisle na sobě v populacích rozmístěných různě po světě dojde k nějaké adaptaci, která je podmíněna například podmínkami prostředí a u všech dotčených populací se adaptace projeví stejně, i přesto, že jsou od sebe vzdálené stovky kilometrů (Colosimo *et al.*, 2005).

Nemusí se ale jednat pouze o opakovanou kolonizaci. Druhy se samozřejmě adaptují i na různé změny prostředí, a proto lze potom studovat rozdíly mezi původními předky a nově odvozenými populacemi. Příznivé mutace tedy pohánějí adaptaci, nicméně studie ukázaly, že rychlost a účinek příznivých mutací se mění během průběhu adaptace kvůli epistatickým interakcím, které upravují biologickou zdatnost (fitness). (Tenaillon *et al.*, 2012)

Byla provedena studie sledující paralelní evoluci u koljušky tříostné (*Gasterosteus aculeatus*). Identifikováno bylo přes 45 tisíc SNPs v každém ze 100 jedinců, kteří byli vybráni ze dvou mořských a tří sladkovodních populací. Data nashromážděná z těchto pěti populací podporují názor, že mořské koljušky se od sebe vzájemně liší velmi málo a to kvůli genovému toku na velké vzdálenosti. Naproti tomu sladkovodní populace vykazují odlišnost vyšší od mořských populací i od sebe navzájem. V případě sladkovodních koljušek lze pozorovat paralelní vymetení, kdy je vybrán jeden nebo více haploidních genotypů tak, aby byl přítomen

v mořské linii předků a byl nezávislý na sladkovodních populacích. Neparalelní vymetení je pozorováno, pokud jsou odlišné alely z běžných mořských variant přesunuty do sladkovodních populací a vyskytují se v nich s vysokou četností. Tím je vytvořen vzorec pro vymetení v každé sladkovodní populaci. Rozdílnosti mezi těmito případy jsou nejvíce zřejmé v celkových porovnáních mořských a sladkovodních populací a při porovnání mezi sladkovodními populacemi navzájem. (Hohenlohe *et al.*, 2010)

## 6.4 Mapování adaptací

Jednou z možností, jak mapovat adaptace, je mapování míst, která ovlivňují komplex znaků (mapování asociací). Toto mapování dává do přímé souvislosti vždy část genotypu s určitou částí fenotypu (Purcell *et al.*, 2003). Mapování asociací v podstatě spočívá v hledání markerů, které mají mezi jednotlivci důležité rozdílnosti ve frekvencích alel (Pritchard *et al.*, 2000).

Pro mapování je vždy využíván určitý software a jednotlivé úkony jdou vždy v určité posloupnosti. Prvním a velice důležitým úkolem je najít asociované markery pro každý kvantitativní znak lokusu (QTL). Je to proto, že tyto QTL právě často podmiňují komplexní znaky. Některé QTL se ale s žádným markerem nespárují a mohou vytvářet falešné asociace. To může být alespoň částečně opraveno užitím matice týkající se odhadů příbuznosti populace. Uživatelé těchto softwarů si pak mohou zvolit různé druhy statistik, které chtějí spočítat a podle toho vyvozovat výsledky. (Bradbury *et al.*, 2007)

## 6.5 NGS studie adaptací

Je několik důvodů, proč se NGS metody využívají při studiích adaptací. Dají se díky nim totiž v genomu najít i místa, která nemají až tak vysoký účinek při genové expresi, ale přesto mohou být důležitá. Prvním důležitým faktem je, že se tyto metody začínají stávat rychlejšími a hlavně levnějšími. Například osekvenování tří miliard párů basí lidského genomu stálo dříve při užití klasické Sangerovy metody zhruba 300 milionů dolarů (což je v přepočtu přibližně sedm miliard korun) a trvalo okolo 4 let. Díky NGS metodám se rychlost až 200x zvýšila a cena naopak snížila. (von Bubnoff, 2008)

Další důležitou výhodou je, že díky NGS přístupům probíhá mnohem snadněji identifikace genů, které mohou adaptaci způsobovat. Spojením výsledků metody 454 a předchozích

genomických studií tak vědci u síha sled'ovitého (*Coregonus clupeaformis*) zjistili, že analýzy SNPs jsou velice důležité při mapování úseků, které jsou s nimi spojené, a tedy podmiňují variabilitu a ovlivňují tak jeho adaptivní divergenci. (Renaut *et al.*, 2010)

Metodou Illumina bylo zkoumáno, jak reaguje přisedle žijící měkkýš ústřice velká (*Crassostrea gigas*) na stresové podmínky rychle se měnícího prostředí mořského dna. Sledována byla formace ulity. Vědci předpokládali dva základní modely formace ulity a to sice matrixový model (Weiner *et al.*, 1984) a buněčný model (Mount *et al.*, 2004). Každý z nich má svá určitá specifika, proto bylo překvapující zjištění, že ne vše se při formování ulity u ústřice shoduje s prvním nebo druhým modelem. Například v matrixovém modelu má být přítomen ve složení ulity chitin i proteiny hedvábí. Přesto byl nalezen pouze chitin a místo hedvábných proteinů mnoho jiných, u kterých se předpokládá, že zastupují funkci proteinů hedvábí (Zhang *et al.*, 2012). Více podobných odchylek je zmiňováno v práci Zhang *et al.* (2012).



## 7. Hybridizace

### 7.1 Co je hybridizace

Hybridizace, neboli křížení, je proces rozmnožování mezi dvěma různými organismy (dostatečně podobnými na to, aby k této události vůbec mohlo dojít) za vzniku potomka, který se označuje jako kříženec (hybrid). U tohoto jedince může být plodnost výrazně snížena, může být dokonce zcela neplodný, případně může mít i jiné vývojové či tělesné vady (Orr, 1995). Nicméně pro evoluci je to důležitý krok, který může zapříčinit vznik nového druhu. V jiných případech může být fitness hybridního jedince vyšší než u rodičovských forem (heterozní efekt) (Ingvarsson & Whitlock, 2000).

Společně s hybridizací se často vyskytuje jev zvaný introgrese. Jedná se o vnesení genů jednoho druhu do genomu druhu jiného. Následně probíhá ještě zpětné křížení s rodičovským druhem (Currat *et al.*, 2008). Spolu s rozšířením multilokusových studií se ukázalo, že hybridizace a introgrese jsou v přírodě velmi rozšířené fenomény, které mohou výrazně přispívat ke vzniku nových forem včetně nových druhů. (Mallet, 2007)

I přestože pro nás je zkoumání hybridů velice zajímavé a může nám říct mnoho nového, byly doby, kdy nebylo požadováno, aby byli kříženci zachováni a nevztahovala se na ně žádná právní ochrana z hlediska ochrany druhů (O'Brien & Mayr, 1991). Zejména kvůli inkompatibilitám, které hybridizace způsobuje, byla ze začátku považována za velkou nevýhodu. Později bylo při studiích na Darwinových pěnkavách zjištěno, že kříženci mají v některých vlastnostech naopak výhodu, například že je u nich snížen efekt inbrední deprese (Grant *et al.*, 2003). Názor na hybridizaci se tedy postupně změnil.

Hybridizace může být jevem přirozeným, ale také antropogenního původu. Přirozená hybridizace má na bohatosti druhů velký podíl. Typickým příkladem pro přirozenou hybridizaci jsou živočichové, kteří za dob ledových přežívali v refugiích a po skončení období chladu se opět začali vracet do jejich přirozených areálů výskytu. Při těchto přesunech se dostali do kontaktu s jinými druhy, mohlo dojít k jejich sekundárnímu kontaktu a vzniku hybridních zón. (Hewitt, 1996)

Pro antropogenní hybridizaci pak existuje ukázkový případ křížení vlků a kojotů v Severní Americe. Mezi těmito dvěma druhy došlo k introgresi několika haplotypů kojotí mtDNA do

vlčího genofondu. Předpokládá se, že tento jev zapříčinilo odlesnění půdy a její přeměna na půdu zemědělskou. Jako důsledek této lidské činnosti se rozšířil areál výskytu kojotů a dostali se tak na území, která původně obývali pouze vlci (Lehman *et al.*, 1991).

## 7.2 Faktory ovlivňující frekvenci hybridizace

### 7.2.1 Izolační mechanismy

Jednou z příčin, že se kříženci neobjevují příliš často, jsou izolační mechanismy. Způsobů, jak od sebe mohou být dva druhy reprodukčně izolované je mnoho. Mohou být izolovány vnějšími bariérami (geografickými) a vnitřními, mezi které patří již dříve zmiňované prezygotické a postzygotické izolační mechanismy (Servedio & Saetre, 2003). Ve většině případů vzniku hybrida zabrání, ale není to stoprocentní. Například nestabilní prostředí, ve kterém žijí sladkovodní ryby obývající severní oblasti, může mít za následek právě prolomení jednoho nebo více izolačních mechanismů a tím pádem uvolnění prostoru pro hybridy (Hubbs, 1955). Hybridizace a izolační mechanismy byly studovány například u sladkovodních ryb *Catostomus commersonii* a *Catostomus macrocheli* (Nelson, 1961).

### 7.2.2 Stáří divergence

Další příčinou, která ovlivňuje množství hybridů, v tomto případě mluvíme o „funkčnosti“ prezygotických a postzygotických mechanismů, je doba, která už uplynula od oddělení dvou druhů (Coyne & Orr, 1989). Čím delší doba od divergence uběhla, tím by měly být izolační mechanismy dokonalejší, lépe vyvinuté.

Také musí být překonán velký skok v genetické vzdálenosti mezi rodičovskými druhy, který způsobuje, že jsou produkováni pouze sterilní či neživotoschopní samci a nebo obě pohlaví. U křížení, která jsou recentnější je toto tedy pouze problémem heterogametického pohlaví (Coyne & Orr, 1996).

### 7.2.3 Rozdílnosti specifické pro taxony

Tyto rozdílnosti, které taxonům dovolují nebo naopak znemožňují se mezi sebou křížit, souvisejí s přechodným bodem. A to tím, že po tom, co se od sebe dva druhy oddělí, mohou ještě nějakou dobu hybridizovat, dokud se neoddělí natolik, že jim to izolační mechanismy a jiné rozdíly mezi nimi už nedovolí. U každého druhu je to samozřejmě jinak. Nejrychleji divergují

savci, takže křížení mezi dvěma druhy probíhá po kratší dobu než například u obojživelníků nebo ptáků (Prager & Wilson, 1975).

Další věcí, která se ale z hlediska genetických analýz nebere moc v úvahu, je důležitost různých rozdílů v chování jednotlivých druhů. Aby došlo ke spáření, mají různé druhy různé taktiky. Jde o izolační mechanismy před pářením a mohou být hlavními mechanismy, které udržují reprodukční izolaci (Price & Bouvier, 2002).

### 7.3 Identifikace hybridů

Kříženci dvou druhů mohou být odlišeni na základě různých vlastností, jako je například jiné zbarvení nebo rozdílná stavba těla. Pro nás je ale nejdůležitější rozlišení na molekulární úrovni.

Pomocí molekulárních metod byli identifikováni a zkoumáni kříženci dvou druhů blatnic *Spea multiplicata* a *Spea bombifrons*. Jejich hybridy byli zkoumáni v souvislosti s vývojem reprodukčních izolací v přirozených přírodních populacích. Bylo zjištěno, že za posledních 27 let intenzita křížení mezi těmito dvěma druhy rapidně poklesla. Pokles frekvence hybridizace se odehrál v řádu jednotek procent z přibližně 5,7% na 0,3%, což naznačuje, že reprodukční izolace se mohou vyvíjet opravdu velmi rychle (Pfenning, 2003). Takto rychlé snížení frekvence kříženců se odehrálo i u populací severoamerických ropuch *Bufo americanus* a *Bufo woodhousii fowleri* (Jones, 1973). Nicméně tento rychlý pokles značí, že druhy musely přijít do kontaktu teprve nedávno. Při bližším průzkumu bylo zjištěno, že teprve ke konci 19. století byly lidmi v přírodě nechtěně vytvořeny podmínky, které umožnily křížení mezi těmito dvěma blatnicemi (Pfenning, 2003).

Další možnost určení hybrida je pomocí cytogenetických rozborů. Tato cytogenetická data nám potom umožňují vidět stav přírodní populace, odkud byly vzorky odebrány. (Carson *et al.*, 1975)

Haldaneovo pravidlo (Haldane, 1922), které říká, že neživotaschopná, sterilní nebo alespoň více ovlivněná hybridními inkompatibilitami jsou spíše pohlaví heterogametického charakteru (*Drosophila* XY, *Abaxas* ZW). Tyto nekompatibility tedy zabraňují mitochondriálnímu přenosu v takovém případě, kdy je heterogametického pohlaví samice (například ptáci, typ

určení pohlaví Abraxas). U savců nebo much (typ určení pohlaví *Drosophila*) je tedy mitochondriální introgrese častým jevem (Sperling, 1990).

Identifikace hybridů většinou vždy slouží k nějakému dalšímu účelu. K porovnání životních podmínek, ve kterých žijí kříženci a rodiče, k porovnání toho, jak a v čem se od sebe křížení potomci a rodiče zásadně liší a tak dále. To proč hybridy zkoumat může být ale mnohem přínosnější.

Při studii provedené v roce 2012 byli sledováni F1 hybridi dvou druhů mečovek *Xiphophorus maculatus* a *Xiphophorus couchianus*. Jejich potomci totiž prokázali velkou schopnost produkovat normální, plodné jedince (Shen *et al.*, 2012). Nicméně se ukázalo, že jedinci jsou citliví na různorodé spontánní nebo indukované novotvary jako například neuroblastomy (Schwab *et al.*, 1979).

Byla využita NGS metoda čtení ABI-SOLiD k identifikaci jednonukleotidových polymorfismů mezi již výše zmíněnými druhy mečovek a ke kvantifikaci alely-specifické genové exprese (ASGE) u F1 hybridů. Ukázalo se, že díky obrovské genové variabilitě a fertilním potomkům jsou druhy mečovek považovány za velice vhodné k dalšímu zkoumání vývoje rozdílností v genové expresi a ke studování komplexu genových interakcí. (Shen *et al.*, 2012)

Dalším praktickým využitím NGS metod (konkrétně se jednalo o metodu Illumina) bylo hledání oblastí genomu, které ovlivňují porodní váhu, váhu při odstavení a denní přírůstek u dobytka. Šlo o druhy Blanco orejnergo a Romosinuano a křížence těchto dvou druhů se Zebu. Studie byla provedena za účelem zjištění, jak vytvářet nová výběrová schémata, která by například zvýšila váhu dobytka i přesto, že se stále přizpůsobuje tropickému prostředí. Navíc bylo pozorováno mnoho polymorfismů s dominantním působením a zajímavý jev, který ukazuje, že křížení může měnit genové akce a tím vysvětluje původ heterózního efektu. (Martínez *et al.*, 2014)

## 8. Závěr

Cílem této práce bylo shrnout základní poznatky k problematice speciace, adaptace a hybridizace, které jsou vzájemně velmi provázané. U každého z těchto jevů bylo zejména vyzvednuto, co způsobuje jejich vznik, jakým způsobem dané jevy indentifikovat či mapovat a využití různých genomických přístupů při jejich dalším studiu. Nakonec vždy bylo vybráno několik příkladů, které ilustrovaly využití v praxi.

Jedna samostatná kapitola byla věnována i NGS metodám, které se v poslední době začínají dostávat v evoluční genetice do popředí, zejména kvůli obrovskému množství dat, které produkují. Společně s nimi je také hojně využíváno identifikování RAD tagů, SNPs či DNA metabarcoding. Nicméně ani klasické metody jako Sangerova či využití mitochondriální DNA nejsou zavrhovány. Stále mají své důležité místo mezi ostatními.

## 9. Seznam použité literatury

- Arnqvist, G., Edvardsson, M., Friberg, U., & Nilsson, T. (2000). Sexual conflict promotes speciation in insects, *97*(19).
- Baird, N. A., Etter, P. D., Atwood, T. S., Currey, M. C., Shiver, A. L., Lewis, Z. A., ... Johnson, E. A. (2008). Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers, *3*(10).
- Bank, C., Bürger, R., & Hermisson, J. (2012). The Limits to Parapatric Speciation: Dobzhansky-Muller Incompatibilities in a Continent-Island model, *191*(3).
- Benton, M. J. (1995). Diversification and extinction in the history of life, *268*(5207).
- Bradbury, P. J., Zhang, Z., Kroon, D. E., Casstevens, T. M., Ramdoss, Y., & Buckler, E. S. (2007). TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples, *23*(19).
- Carneiro, M. O., Russ, C., Ross, M. G., Gabriel, S. B., Nusbaum, C., & DePristo, M. a. (2012). Pacific biosciences sequencing technology for genotyping and variation discovery in human data, *13*(1).
- Carson, H. L., Nair, P. S., & Sene, F. M. (1975). *Drosophila* Hybrids in Nature: Proof of Gene Exchange Between Sympatric Species, *189*(1).
- Collins, F., Brooks, L., & Chakravarti, A. (1998). A DNA Polymorphism Discovery Resource for Research on Human Genetic Variation, *8*(12).
- Colosimo, P. F., Hosemann, K. E., Balabhadra, S., Jr, G. V., Dickson, M., Grimwood, J., ... Kingsley, D. M. (2005). Widespread Parallel Evolution in Sticklebacks by Repeated Fixation of Ectodysplain Alleles, *307*(March).
- Coyne, J. A., & Orr, H. A. (1989). Patterns of Speciation in *Drosophila*, *43*(2).
- Coyne, J. A., & Orr, H. A. (1996). "Patterns of Speciation in *Drosophila*" Revisited, *51*(1).
- Curat, M., Ruedi, M., Petit, R. J., & Excoffier, L. (2008). The hidden side of invasions: Massive introgression by local genes, *62*(8).
- DeWitt, T. J., Sih, A., & Wilson, D. S. (1998). Cost and limits of phenotypic plasticity, *13*(97).
- Dieckmann, U., & Doebeli, M. O. (1999). On the origin of species by sympatric speciation, *400*(22).
- Dobzhansky, T. (1936). Studies on Hybrid Sterility. II. Localization of Sterility Factors in *Drosophila Pseudoobscura* Hybrids, *21*(2).
- Gacía-Ramos, G., & Kirkpatrick, M. (1997). Genetic Models of Adaptation and Gene Flow in

- Peripheral Populations, 51(1).
- Gavrilets, S., Li, H., & Vose, M. D. (2000). Patterns of Parapatric Speciation, 54(4).
- Gavrilets, S., & Waxman, D. (2002). Sympatric speciation by sexual conflict, 99(16).
- Grant, P. R., Grant, B. R., Keller, L. F., Markert, J. A., & Petren, K. (2003). Inbreeding and Interbreeding in Darwin's Finches, 57(12).
- Haldane, J. B. S. (1922). Sex ration and unisexual sterility in hybrid animals, XII(2).
- Hamann, H. (2013). Lessons from Speciation Dynamics: How to Generate Selective Pressure towards Diversity, 19(3/4).
- Hendry, A. P. (2009). Ecological speciation! Or the lack thereof?, 66(8).
- Hereford, J. (2009). A Quantitative Survey of Local Adaptation and Fitness Trade-Offs, 173(5).
- Hewitt, G. M. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation, 58(3).
- Hohenlohe, P. A., Bassham, S., Etter, P. D., Stiffler, N., Johnson, E. A., & Cresko, W. A. (2010). Population genomics of parallel adaptation in threespine stickleback using sequenced RAD tags, 6(2).
- Hoskin, C. J., Higgie, M., McDonald, K. R., & Moritz, C. (2005). Reinforcement drives rapid allopatric speciation, 437(7063).
- Hubbs, C. L. (1955). Hybridization between Fish Species in Nature, 4(1).
- Ingvarsson, P. K., & Whitlock, M. C. (2000). Heterosis increases the effective migration rate, 267(1450).
- Jones, J. M. (1973). Effects of thirty years hybridization on the toads *Bufo americanus* and *Bufo woodhousii fowleri* at Bloomington, Indiana, 27(3).
- Keller, I., Wagner, C. E., Greuter, L., Mwaiko, S., Selz, O. M., Sivasundar, A., ... Seehausen, O. (2013). Population genomic signatures of divergent adaptation, gene flow and hybrid speciation in the rapid radiation of Lake Victoria cichlid fishes, 22(11).
- Kircher, M., & Kelso, J. (2010). High-throughput DNA sequencing - concepts and limitations, 32(6).
- Kircher, M., Stenzel, U., & Kelso, J. (2009). Improved base calling for the Illumina Genome Analyzer using machine learning strategies, 10(8).
- Lehman, N., Eisenhawer, A., Hansen, K., Mech, L. D., Peterson, R. O., Gogan, P. J. P., & Wayne, R. K. (1991). Introgression of Coyote Mitochondrial DNA Into Sympatric North American Gray Wolf Populations, 45(1).
- Losos, J. B., & Glor, R. E. (2003). Phylogenetic comparative methods and the geography of

- speciation, *18*(5).
- \* Mallet, J. (2007). Hybrid speciation, *446*(7133).
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., ... Rothberg, J. M. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors, *437*(September).
- Martínez, R., Gómez, Y., & Rocha, J. F. M. (2014). Genome-wide association study on growth traits in Colombian creole breeds and crossbreeds with Zebu cattle, *13*(3).
- McCarthy, A. (2010). Third generation DNA sequencing: Pacific biosciences' single molecule real time technology, *17*(7).
- Meller, A., & Branton, D. (2002). Single molecule measurements of DNA transport through a nanopore., *23*(16).
- Merrill, R. M., Gompert, Z., Dembeck, L. M., Kronforst, M. R., Mcmillan, W. O., & Jiggins, C. D. (2011). Mate preference across the speciation continuum in a clade of mimetic butterflies, *65*(5).
- Michel, A. P., Sim, S., Powell, T. H. Q., Taylor, M. S., Nosil, P., & Feder, J. L. (2010). Widespread genomic divergence during sympatric speciation, *107*(21).
- Miller, M. R., Dunham, J. P., Amores, A., Cresko, W. A., & Johnson, E. A. (2007). Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers, *17*.
- Mount, A. S., Wheeler, A. P., Paradkar, R. P., & Snider, D. (2004). Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster, *304*(5668).
- Neff, M. M., Turk, E., & Kalishman, M. (2002). Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis, *18*(12).
- Nelson, J. S. (1961). Hybridization and Isolating Mechanisms between *Catostomus commersonii* and *C. macrochelyus* (Pisces: Catostomidae), *25*(1).
- Noor, M. A. F., Grams, K. L., Bertucci, L. A., & Reiland, J. (2001). Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species, *98*(21).
- O'Brien, S. J., & Mayr, E. (1991). Bureaucratic Mischief: Recognizing Endangered Species and Subspecies, *251*(4998).
- Orr, H. A. (1995). The Population Genetics of Speciation: The Evolution of Hybrid Incompatibilities, *139*(4).
- Penny, D., & Poole, A. (1999). The nature of the last universal common ancestor, *9*(6).
- Pfenning, K. S. (2003). A test of alternative hypotheses for the evolution of reproductive isolation between spadefoot toads: Support for the reinforcement hypothesis, *57*(12).



- Powell, T. H. Q., Hood, G. R., Murphy, M. O., Heilveil, J. S., Berlocher, S. H., Nosil, P., & Feder, J. L. (2013). Genetic divergence along the speciation continuum: The transition from host race to species in *Rhagoletis* (diptera: Tephritidae), 67(9).
- Prager, E. M., & Wilson, A. C. (1975). Slow Evolutionary Loss of the Potential for Interspecific Hybridization in Birds: A Manifestation of Slow Regulatory Evolution, 72(1).
- Price, T. D., & Bouvier, M. M. (2002). The Evolution of F1 Postzygotic Incompatibilities in Birds, 56(10).
- Pritchard, J. K., & Di Rienzo, A. (2010). Adaptation – not by sweeps alone, 11(10).
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Rosenberg, N. A., & Donnelly, P. (2000). Association Mapping in Structured Populations, 67(1).
- Purcell, S., Cherny, S. S., & Sham, P. C. (2003). Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits., 19(1).
- Rabosky, D. L. (2009). Ecological limits and diversification rate: Alternative paradigms to explain the variation in species richness among clades and regions, 12(8).
- Renaut, S., Nolte, A. W., & Bernatchez, L. (2010). Mining transcriptome sequences towards identifying adaptive single nucleotide polymorphisms in lake whitefish species pairs (*Coregonus* spp. Salmonidae), 19(SUPPL. 1).
- Rocha, L. A., Robertson, D. R., Roman, J., & Bowen, B. W. (2005). Ecological speciation in tropical reef fishes, 272(March).
- Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., ... Bustillo, J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing, 475(7356).
- Rundell, R. J., & Price, T. D. (2009). Adaptive radiation, nonadaptive radiation, ecological speciation and nonecological speciation, 24(7).
- \* Savolainen, O., Lascoux, M., & Merilä, J. (2013). Ecological genomics of local adaptation, 14(11).
- \* Seehausen, O., Butlin, R. K., Keller, I., Wagner, C. E., Boughman, J. W., Hohenlohe, P. A., ... Widmer, A. (2014). Genomics and the origin of species, 15(3).
- Servedio, M. R., & Saetre, G.-P. (2003). Speciation as a positive feedback loop between postzygotic and prezygotic barriers to gene flow, 270(1523).
- Shaw, K. L., & Mullen, S. P. (2014). Speciation continuum, 105(S1).
- Shen, Y., Catchen, J., Garcia, T., Amores, A., Beldorth, I., Wagner, J., ... Walter, R. B. (2012). Identification of transcriptome SNPs between *Xiphophorus* lines and species for

- assessing allele specific gene expression within F1 interspecies hybrids, *155*(1).
- Schwab, M., Kollinger, G., Haas, J., Ahuja, M. R., Abdo, S., Andâ, A., & Anders, F. (1979). Genetic Basis of Susceptibility for Neuroblastoma following Treatment with N-Methyl-Nnitrosourea and X-Rays in *Xiphophorus*, *39*(2).
- Sperling, A. H. (1990). Natural hybrids of *Papilio* (Insecta: Lepidoptera): Poor taxonomy or interesting evolutionary problem?, *68*(8).
- Sun, S., Ting, C.-T., & Wu, C.-I. (2004). The Normal Function of a Speciation Gene, *Odysseus*, and Its Hybrid Sterility Effect, *305*(July).
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., & Willerslev, E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding, *21*(8).
- Tenaillon, O., Rodríguez-Verdugo, A., Gaut, R. L., McDonald, P., Bennett, A. F., Long, A. D., & Gaut, B. S. (2012). The Molecular Diversity of Adaptive Convergence, *335*(6067).
- Via, S., & West, J. (2008). The genetic mosaic suggests a new role for hitchhiking in ecological speciation, *17*(19).
- von Bubnoff, A. (2008). Next-Generation Sequencing: The Race Is On, *132*(5).
- Weiner, S., Traub, W., & Parker, S. B. (1984). Macromolecules in Mollusc Shells and Their Functions in Biomineralization, *304*(1121).
- Zandt, P. A. van, & Mopper, S. (1998). A Meta-Analysis of Adaptive Deme Formation in Phytophagous Insect Populations, *152*(4).
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., ... Wang, J. (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation, *490*(7418).
- Zhou, H., Li, D., Tam, N. F., Jiang, X., & Zhang, H. (2010). BIPES, a cost-effective high-throughput method for assessing microbial diversity, *5*(4).